

533,310

Rec'd PCT/PTO

29 APR 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/039969 A1(51) 国際特許分類:  
15/56, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21

C12N 9/42,

(74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目6番8号板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014013

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 31 日 (31.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-318303

2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡倉 薫 (OKAKURA, Kaoru) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP). 矢内 耕二 (YANAI, Koji) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL CELLULASE TOLERANT TO SURFACTANTS

(54) 発明の名称: 界面活性剤に耐性な新規セルラーゼ

(57) **Abstract:** A novel cellulase having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of cellulase NCE5 by substitution of the amino acid residues at the 162- and/or 166-positions by amino acids different from those of cellulase NCE5; a polynucleotide encoding this novel cellulase; an expression vector containing the same; host cells transformed by the expression vector; and a cellulase preparation and a detergent composition containing the above cellulase. This cellulase is tolerant to surfactants and sustains a high activity even under alkaline conditions.

(57) 要約: セルラーゼNCE5の162番目及び/又は166番目のアミノ酸残基が、前記セルラーゼのアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する新規セルラーゼを開示する。また、前記の新規セルラーゼをコードするポリヌクレオチド、それを含む発現ベクター、前記発現ベクターで形質転換された宿主細胞、並びに前記セルラーゼを含むセルラーゼ調製物及び洗剤組成物を開示する。本発明のセルラーゼは、界面活性剤に耐性であり、かつアルカリ性条件下でも高い活性を保持している。

WO 2004/039969 A1

## 明 細 書

## 界面活性剤に耐性な新規セルラーゼ

## 技術分野

本発明は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる親セルラーゼの一部のアミノ酸配列が置換されたアミノ酸配列を有する新規なセルラーゼに関する。

## 背景技術

セルラーゼは、その特性を活かしてさまざまな産業分野で利用されている。具体的な利用分野の一つは繊維加工分野であり、特にセルロース含有繊維に所望の特性を与えるための処理がなされている。すなわち、セルロース含有繊維の肌ざわり及び／又は外観を改善するために、そして、着色されたセルロース含有繊維に色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」様外観を与える「バイオウォッシュ」のためにセルラーゼが使用されている。また、近年では木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒に溶解して紡糸する再生セルロース系繊維であるリヨセルが、その強度や吸水性等の性質、更には環境汚染を起こしにくい製造法から注目を集めているが、その製造工程で発生する織物表面の毛羽を除く加工にセルラーゼが用いられている。

従来、セルラーゼは複数の酵素の共同作用によりセルロースを分解する作用があるとされてきた。近年、タンパク質分離技術や遺伝子技術の進展により、複合酵素であるセルラーゼから、前記の繊維加工に適した酵素成分を分離し製造する試みがなされている。とりわけ、糸状菌のトリコデルマ (*Trichoderma*) 属又はフミコーラ (*Humicola*) 属由来のセルラーゼについては研究が進み、フミコーラ属では、CBH I、EG V、NCE4、及びNCE2などが、トリコデルマ属では、CBH I、CBH II、EG II、及びEG IIIなどの成分が単離され、遺伝子操作によって過剰発現酵素やモノコンポーネント酵素などを調製することにより、各用途に適した特定セルラーゼ成分を多量に含むセルラーゼ調製物が製造されるようになってきた。

また、エンドグルカナーゼ酵素NCE5は、デニム染めセルロース含有繊維へのス

トーンウォッシュ外観の付与、又は肌触りの改善において、その処理工程中で衣料にインジゴ染料の一部が再付着又は逆染色、すなわち白場汚染 (back staining) の度合いが低いセルラーゼとして有用であることが知られている (特許文献1参照)。

一方、セルラーゼを衣料用洗淨剤用途に用いる場合には、必要なセルラーゼ成分を量的に改善するだけでなく質的に改善することが望まれている。すなわち、衣料用洗淨剤には各種界面活性剤が配合されているとともに、これを水に溶解した場合アルカリ性 (pH 10~11) を示すことから、衣料用洗淨剤に配合されるセルラーゼの性質として各種界面活性剤に対して耐性であること及びアルカリ性条件下でより強い活性を示すことが求められている。

(特許文献1) 国際公開第WO 01/90375号パンフレット (第2-3頁及び配列表の配列番号1で表される配列)

#### 発明の開示

本発明は、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性を有する新規なセルラーゼを提供することを課題とする。

本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるセルラーゼ (NCE5) において、そのアミノ酸配列における162番目及び／又は166番目のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することによって、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性を有する新規なセルラーゼを取得することに成功した。すなわち本発明は、以下の通りである。

[1] (1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるセルラーゼの162番目及び／又は166番目のアミノ酸残基が、前記セルラーゼのアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列、あるいは、(2) 前記アミノ酸配列(1)のN末端に1又は複数個のアミノ酸が付加又は欠失したアミノ酸配列を有する、セルラーゼ。

[2] 配列番号3で表されるアミノ酸配列を有する、前記[1]のセルラーゼ。

[3] 166番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されてい

る、前記〔１〕のセルラーゼ。

〔４〕配列番号４で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔３〕のセルラーゼ。

〔５〕配列番号５で表されるアミノ酸配列を有するセルラーゼ。

〔６〕前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼをコードするポリヌクレオチド。

〔７〕前記〔６〕のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

〔８〕前記〔７〕の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

〔９〕前記〔８〕の宿主細胞を培養し、その宿主及び／又はその培養物からセルラーゼを採取する工程を含む、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼの製造法。

〔１０〕前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼを含む、セルラーゼ調製物。

〔１１〕前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、又は前記〔１０〕のセルラーゼ調製物を含む、洗剤組成物。

〔１２〕セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

〔１３〕セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

〔１４〕セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的として減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

〔１５〕着色されたセルロース含有繊維の色を澄明化する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

〔１６〕着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させるエ

程を含む、前記方法。

〔１７〕セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、前記

〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物、又は前記〔１１〕の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

〔１８〕繊維の処理がその繊維の浸漬、洗濯、又はすすぎを通じて行われる、前記〔１２〕～〔１７〕の方法。

〔１９〕古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする、古紙の脱インキ方法。

〔２０〕紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、前記方法。

〔２１〕動物飼料の消化能を改善する方法であって、セルロース含有繊維を、前記〔１〕～〔５〕のセルラーゼ、前記〔１０〕のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、前記方法。

本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAが含まれる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 親セルラーゼ

本発明において、親セルラーゼとは、配列番号１で表されるアミノ酸配列よりなるセルラーゼである。また、本親セルラーゼを生産する宿主の種類によっては分泌シグナル配列のプロセッシングが異なることがあることから、その結果としてN末端に１～複数個のアミノ酸が付加又は欠失されたような相同体も親セルラーゼに含まれる。

#### 本発明における新規なセルラーゼ

本発明における新規なセルラーゼは、親セルラーゼが配列番号１で表されるア

ミノ酸配列よりなるものである場合、そのアミノ酸配列中の162及び166番目のアミノ酸から選択される1個又は2個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基によって置換されたセルラーゼがその具体例として挙げられるが、天然に分離された菌株等から結果として得られたセルラーゼも、配列番号1で表されるアミノ酸配列における162及び／又は166番目のアミノ酸、又はそれに相当するアミノ酸が置換されたセルラーゼである限り、本発明のセルラーゼに含まれる。

本発明の好ましい態様によれば、配列番号1に記載されたアミノ酸配列の162番目のアミノ酸がプロリンに、166番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されたものが好ましいものとして挙げられる。本発明の更に好ましい態様によれば、配列番号3～配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するセルラーゼが更に好ましいものとして挙げられる。これらのセルラーゼは、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性が保持されるという有利な性質を有している。

また、親セルラーゼが配列番号1で表されるアミノ酸配列の相同体である場合には、配列番号1で表されるアミノ酸配列の162及び166番目のアミノ酸に相当する位置のアミノ酸から選択される1個又は2個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基により置換されてなるものがその具体例として挙げられる。ここで、配列番号1で表されるアミノ酸配列よりなる親セルラーゼの相同体において置換されるべきアミノ酸残基の位置は、公知のアルゴリズムによるアミノ酸配列の比較によって容易に選択することができる。

#### 本発明における新規なセルラーゼの作製

本発明の新規なセルラーゼは、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができるほか、天然から分離された菌株から取得することもできる。

組換えDNA技術を用いる場合には、親セルラーゼをコードするDNAを取得し、このDNA内で特異的部位に突然変異を発生させてコードするアミノ酸を置換させた後、変異処理を施したDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を培養することによって新規なセルラーゼを調製することができる。親セルラーゼをコードするDNAとしては、使用する宿主細胞を勘案し、配列番号1で表

されるアミノ酸配列から適宜全合成可能であるが、好ましくは配列番号2で表される塩基配列からなるものであり、これはフミコーラ・インソレンスのcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法で取得可能である。

遺伝子の特定部位に突然変異を導入するための幾つかの方法は、Gapped duplex法 [Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)]、Kunkel法 [Methods in Enzymology, 154, 367 (1987)] など当業者に公知である。これらの方法は、親セルラーゼをコードするDNA内で特異的部位に突然変異を発生させることに利用することができる。変異処理後のDNAの塩基配列は、マキサム・ギルバードの化学修飾法 [Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)] やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Gene, 19, 269 (1982)] 等により確認することができ、本発明におけるセルラーゼのアミノ酸配列は、確認された塩基配列より解読することができる。

#### 本発明における新規なセルラーゼの生産

本発明におけるセルラーゼは、それをコードするDNA断片を、宿主細胞内で複製可能且つ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行い、その宿主細胞において産生させることができる。

よって、本発明においては、前記の本発明によるセルラーゼをコードするDNA断片を、宿主微生物内で複製可能で、且つ、そのDNA断片がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるDNA断片の他に、その発現を制御するDNA配列や形質転換体を選択するための遺伝子マーカー等を

含んでいるのが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーター、ターミネーター及びシグナルペプチドをコードするDNA配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるDNA配列より得ることができる。また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、又は糸状菌などを用いた系、及び、それらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から前記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

#### 本発明における新規なセルラーゼの用途/セルラーゼ調製物

本発明は、本発明のセルラーゼを含むセルラーゼ調製物に関する。

一般に、セルラーゼ調製物とは、セルラーゼ酵素の他に、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、又はソルビトール等）、防腐剤、及び／又は非イオン系界面活性剤等を含有させることができる。また、セルラーゼ調製物の形態は、固形状であっても液体状であってもよく、具体的には、粉剤、粒剤、顆粒剤、非粉塵化顆粒、又は液体製剤が挙げられる。本発明のセルラーゼ調製物には、本



発明のセルラーゼに加えて、他のセルラーゼ酵素、例えば、セロビオヒドロラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ及び本発明以外のエンドグルカナーゼを含めてもよい。

セルラーゼ調製物の１種である非粉塵化顆粒（好ましくは、飛散性のない顆粒状）は、通常の乾式造粒法を用いて製造することが可能である。すなわち、粉末状態の本発明のセルラーゼを、中性でエンドグルカナーゼ活性に影響を及ぼさない無機塩（例えば、硫酸ナトリウム又は塩化ナトリウム）、エンドグルカナーゼ活性に影響を及ぼさない鉱物（例えば、ベントナイト又はモンモリナイト）、及び中性の有機物（例えば、澱粉又は粒状セルロース等）等から選ばれる１種又は複数種に混合した後、非イオン界面活性剤の１種又は複数種の粉末、あるいは微細に懸濁された懸濁液を加え、十分に混合又は混練する。状況に応じ、固形物を結着させる合成高分子（例えば、ポリエチレングリコール等）又は天然高分子（例えば、スターチ等）を適宜添加し、更に混練した後、ディスクペレッターなどの押し出し成形造粒を行い、成形物をマルメライザーにより球状に成形後、乾燥させることで非粉塵化顆粒を製造することが可能である。非イオン界面活性剤の１種又は複数の添加量は特に限定されないが、本発明のセルラーゼ調製物の全体に対して、好ましくは０．１～５０重量％、より好ましくは０．１～３０重量％、更に好ましくは１～１０重量％とする。また、顆粒表面をポリマー等でコーティングすることにより、酸素透過や水分透過をコントロールすることも可能である。

一方、セルラーゼ調製物の１種である液状製剤（好ましくは、安定化された液体状）は、本発明のセルラーゼを含む溶液に、エンドグルカナーゼの安定化剤（例えば、合成高分子又は天然高分子等）を配合し、必要に応じて無機塩類及び／又は合成防腐剤を添加して調製することが可能である。このとき、非イオン界面活性剤の１種又は複数種を配合することも可能である。非イオン界面活性剤の１種又は複数種の添加量は特に限定されないが、本発明のセルラーゼ調製物の全体に対して、好ましくは０．１～５０重量％、より好ましくは０．１～３０重量％、更に好ましくは１～１０重量％とする。

更に、本発明は、本発明のセルラーゼ又は本発明のセルラーゼ調製物を含む洗剤組成物を提供する。前記洗剤組成物は、界面活性剤（アニオン性、ノニオン性、

カチオン性、両性又は双性イオン性あるいはそれらの混合物であり得る)をも含有し得る。また、前記洗剤組成物は、当分野で既知の他の洗剤成分、例えば、ビルダー、漂白剤、漂白活性剤、腐食防止剤、金属イオン封鎖剤、汚れ解離ポリマー、香料、他の酵素(プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼなど)、酵素安定剤、製剤化補助剤、蛍光増白剤、及び/又は発泡促進剤等をも含有し得る。代表的なアニオン性界面活性剤は、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)、アルキル硫酸塩(AS)、アルファーオレフィンスルホン酸塩(AOS)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩(AES)、 $\alpha$ -スルホ脂肪酸エステル塩( $\alpha$ -SFM<sub>e</sub>)及び天然脂肪酸のアルカリ金属塩等がある。ノニオン性界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(AE)、アルキルポリエチレングリコールエーテル、ノニルフェノールポリエチレングリコールエーテル、脂肪酸メチルエステルエトキシレート、スクロース、及びグルコースの脂肪酸エステル、並びにアルキルグルコシド、ポリエトキシ化アルキルグルコシドのエステル等がある。

本発明のセルロース含有繊維の処理方法は、本発明のセルラーゼ、本発明のセルラーゼ調製物、又は本発明の洗剤組成物を、セルロース含有繊維と接触させることにより行う。

本発明の繊維処理方法により改善されうる、セルロース含有繊維の性質としては、以下のものが含まれる。

- (1) 毛羽の除去(毛羽立ち始める速度の低減、又は毛羽立ちの低減)
- (2) 減量による繊維の肌触り及び外観の改善
- (3) 着色セルロース含有繊維の色の澄明化
- (4) 着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化の付与、すなわち、着色セルロース含有繊維、代表的にはジーンズへのストーンウォッシュ様の外観及び風合いの付与
- (5) 柔軟化(ごわつき始める速度の低減、又はごわつきの低減)

本発明の繊維処理方法は、具体的には、繊維が浸漬されているか又は浸漬される水に、本発明のセルラーゼ、本発明のセルラーゼ調製物、又は本発明の洗剤組成物を添加することにより行うことができ、例えば、繊維の浸漬工程、洗濯工

程、又はすすぎ工程で行うことができる。

接触温度、又は前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、若しくは前記洗剤組成物の添加量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えば、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するか又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する場合、 $10 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01 \sim 20 \text{ mg/L}$ のタンパク質濃度の前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、又は前記洗剤組成物を使用することが好ましい。

更に、セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的とした減量加工の場合、 $10 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.1 \sim 50 \text{ mg/L}$ のタンパク質濃度の前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、又は前記洗剤組成物を使用することが好ましい。

また、着色されたセルロース含有繊維の色を澄清化することを目的とした場合、 $10 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01 \sim 20 \text{ mg/L}$ のタンパク質濃度の前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、又は前記洗剤組成物を使用することが好ましい。

また、着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供するために用いる場合、 $20 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.1 \sim 100 \text{ mg/L}$ のタンパク質濃度の前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、又は前記洗剤組成物を使用することが好ましい。

また、前記の方法は、セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減するか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減させる場合、 $10 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01 \sim 20 \text{ mg/L}$ のタンパク質濃度の前記セルラーゼ、前記セルラーゼ調製物、又は前記洗剤組成物を使用することが好ましい。

更に、本発明は、古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、本発明のセルラーゼ又は本発明のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする古紙の脱インキ方法に関する。

本発明のセルラーゼ又はセルラーゼ調製物は、古紙に作用させると脱インキの効率を向上させるため、古紙から再生紙を製造する過程において有用である。前記脱インキ方法によれば、残インキ繊維が大幅に減少するため、古紙の白色度を

向上させることができる。

前記脱インキ薬品は、一般に古紙の脱インキに用いられる薬品であればよく、特に限定されないが、例えば、アルカリ（例えば、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム等）、珪酸ソーダ、過酸化水素、燐酸塩、アニオン系の界面活性剤、ノニオン系の界面活性剤、又は補集材（例えば、オレイン酸等）などが挙げられ、助剤として、pH安定剤、キレート剤、又は分散剤等が挙げられる。

前記脱インキ方法を適用し得る古紙は、一般に古紙と呼ばれるものであればよく、特に限定されないが、例えば、機械パルプ及び化学パルプを配合した新聞古紙、雑誌古紙、下級～中級印刷古紙、化学パルプよりなる上質古紙、又はこれらの塗工紙等の印刷古紙が挙げられる。更に、一般に古紙と呼ばれるもの以外であっても、インクの付着している紙であれば、前記脱インキ方法を適用することができる。

更に、本発明は、紙パルプのろ水性の改善方法に関し、前記方法は、紙パルプを、本発明のセルラーゼ又は本発明のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む。

前記方法によれば、紙パルプのろ水性が、強度の著しい低下を伴うことなく、有意に改善されるものと考えられる。前記方法を適用し得るパルプは特に限定されないが、例えば、古紙パルプ、再循環板紙パルプ、クラフトパルプ、亜硫酸パルプ、又は加工熱処理その他の高収率パルプ等が挙げられる。

更に、本発明は、動物飼料の消化能を改善する方法に関し、動物飼料を、本発明のセルラーゼ又は本発明のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む。

前記方法によれば、動物飼料中のグルカンが適度に低分子化されるため、動物飼料の消化能を改善することができる。

更に、本発明によるセルラーゼを動物飼料中で用いることにより、飼料中のグルカンの消化能を改善することができる。従って、本発明によれば、動物飼料の消化能を改善する方法であって、本発明のセルラーゼ又はセルラーゼ調製物で動物飼料を処理する工程を含む方法が提供される。

以上、本発明のセルラーゼ及び洗剤組成物並びにそれらを用いる本発明方法について説明したが、本発明セルラーゼの親セルラーゼであるセルラーゼNCE5が、セルラーゼ調製物又は洗剤組成物の有効成分として用いることができ、これらの

セルラーゼNCE5又はセルラーゼNCE5含有セルラーゼ調製物若しくは洗剤組成物を用いることにより、例えば、セルロース含有繊維の各種性質を改善〔例えば、毛羽の除去（毛羽立ち始める速度の低減、又は毛羽立ちの低減）、減量による繊維の肌触り及び外観の改善、着色セルロース含有繊維の色の澄明化、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化の付与、又は柔軟化（ごわつき始める速度の低減、又はごわつきの低減）など〕することができること、古紙の脱インキを行うことができること、紙パルプのろ水性を改善することができること、あるいは、動物飼料の症可能を改善することができることは、国際公開第WO 01/90375号パンフレットに開示されている。本発明のセルラーゼは、親セルラーゼであるNCE5と比較して、優れた界面活性剤耐性及びアルカリ耐性を示しており、従って、セルラーゼ調製物又は洗剤組成物の有効成分として、あるいは、セルラーゼNCE5を用いて実施する前記各種方法において、セルラーゼNCE5に代えて、本発明のセルラーゼを使用することにより、より優れた効果を期待することができる。

#### 微生物の寄託

本発明の親セルラーゼをコードするDNAを含むプラスミドpNCE5Bamで形質転換された大腸菌JM109株は、平成12年（2000年）4月18日よりFERM BP-7138の受託番号のもと独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター〔（旧）工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）〕に寄託されている。

また、実施例2（2）で使用するフミコーラ・インソレンス FERM BP-5977株は、平成8年（1996年）7月15日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国内寄託（FERM P-15736）されたものであり、平成9年（1997年）6月13日から国際寄託（FERM BP-5977）に移管されている。

#### 実施例

以下に本発明の実施例を示すが、これは単なる一例であって本発明を限定するものではなく、ここに例示しなかった多くの変法あるいは修飾手段のすべてを包括するものである。

#### 実施例1：セルラーゼをコードする遺伝子の作成

配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる親セルラーゼの162番目のアミノ酸がプロリンに置換されたセルラーゼ（以下A162Pとする。配列番号3）、166番目のアミノ酸がグルタミン酸に置換されたセルラーゼ（以下K166Eとする。配列番号4）、162番目及び166番目のアミノ酸がそれぞれプロリン及びグルタミン酸に置換されたセルラーゼ（以下APKEとする。配列番号5）をコードするDNAは以下に示すようにして作成した。

国際公開第WO 01/90375号パンフレットに記載のプラスミドpNCE5Bamを鋳型DNAとし、LA PCR in vitro Mutagenesis Kit（宝酒造株式会社製）を使用して親セルラーゼをコードするDNAに部位特異的変異を導入した。方法はキットに添付のプロトコールに従った。変異導入用のプライマーとして以下に示す3種のプライマーを使用した。

NCE5-A162P : 5'-GGGGAAGGGGTCGCACTCGTGGCGTTG-3'（配列番号6）

NCE5-K166E : 5'-CTTGAGCTCCTCGGGGAAGGCGTCGCA-3'（配列番号7）

NCE5-APKE : 5'-GAGCTCCTCGGGGAAGGGGTCGCACTCGTG-3'（配列番号8）

プライマーNCE5-A162PはセルラーゼA162PをコードするDNAを作成するためのプライマーであり、プライマーNCE5-K166EはセルラーゼK166EをコードするDNAを作成するためのプライマーであり、プライマーNCE5-APKEはセルラーゼAPKEをコードするDNAを作成するためのプライマーである。

前記3種のプライマーを使用して得られた変異導入PCR産物を制限酵素EcoR I及びPst Iで消化後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出しエタノール沈殿を行った。これらを予め制限酵素EcoR I及びPst Iで消化しておいたプラスミドpUC118と連結し、プラスミドpNCE5AP-118

（A162P）、pNCE5KE-118（K166E）及びpNCE5APKE-118（APKE）を得た。これら3種のプラスミドの挿入断片について全塩基配列を蛍光DNAシーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer（パーキン・エルマー社製）を用いて決定した結果、各DNA断片には目的の変異のみが導入されていることが確認された。

## 実施例2：各セルラーゼ遺伝子のフミコーラ・インソレンスでの発現

### （1）セルラーゼ遺伝子発現用プラスミドの構築

実施例1で得られた各セルラーゼ遺伝子を含むプラスミドpNCE5AP-118、

pNCE5KE-118及びpNCE5APKE-118を制限酵素BamH Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.7kbpのDNA断片を回収した。これらを、予め制限酵素BamH Iで消化し、大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を用いてDNA末端を脱リン酸化しておいたフミコーラ・インソレンス FERM BP-5977用発現ベクターpJD-c5（国際公開第W0 01/90375号パンフレットに記載）と連結し、各セルラーゼ遺伝子を発現させるためのプラスミドpNCE5AP（A162P）、pNCE5KE（K166E）、及びpNCE5APKE（APKE）を得た。

## (2) フミコーラ・インソレンス FERM BP-5977の形質転換

フミコーラ・インソレンス FERM BP-5977を（S）培地中37°Cで培養し、24時間後、3000 rpm、10分間遠心分離により集菌した。（S）培地の組成は、（N）培地（5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%塩化マグネシウム、pH 6.8）にグルコース（3.0%）を加え、アビセルを除いたものである。得られた菌体を0.5 mol/L シュークロースで洗浄し、0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液（3 mg/mL - glucuronidase、1 mg/mL Chitinase、1mg/mL Zymolyase、0.5 mol/L シュークロース）10 mLに懸濁した。30°Cで60~90分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、2500 rpm、10分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC緩衝液 [0.5 mol/L シュークロース、10 mmol/L 塩化カルシウム、10 mmol/L トリス塩酸（pH 7.5）] で洗浄した。

以上のように調製したプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁し、この100  $\mu$ Lに対し10  $\mu$ gのDNA（TE）溶液（10  $\mu$ L）を加え氷中に5分間静置した。次に、400  $\mu$ LのPEG溶液 [60% PEG4000、10 mmol/L 塩化カルシウム、10 mmol/L トリス塩酸（pH 7.5）] を加え、氷中に20分間静置した後、10 mLのSUTC緩衝液を加え、2500 rpm、10分間遠心分離した。集めたプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁した後、4000 rpmで5分間遠心分離して、最終的に100  $\mu$ LのSUTC緩衝液に懸濁した。

以上の処理を加えたプロトプラストを、ハイグロマイシン（200  $\mu$ g/mL）添加YMG培地 [1% グルコース、0.4% 酵母エキス、0.2% モルトエキス、1%寒天（pH 6.8）] 上に、YMG軟寒天とともに重層し、37°C、5日間培養後、形成したコ

ロニーを形質転換体とした。

### (3) SDS-PAGEによる形質転換体の評価

前述のようにしてプラスミドpNCE5AP、pNCE5KE、及びpNCE5APKEを用いて得られたフミコーラ・インソレンス 形質転換体を (N) 培地 (5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%塩化マグネシウム、pH 6.8) で37°C、5日間培養し、得られた培養上清をSDS-PAGEにより分析した。

SDS-PAGEはテフコ社のシステムを用いて実施した。すなわち、電気泳動槽 (No. 03-101)、電源 (Model : 3540)、ゲル12 % (01-005)、及びSDS-PAGE用バッファーキット (06-0301) を用いた。泳動条件は、18 mA/90分とした。泳動後のゲルの染色は、クマシーブリリアントブルーR250染色液 (0.1 %クマシーブリリアントブルーR 250、40%メタノール、10%酢酸) を用いて行い、その後脱色液 (10 %メタノール、7.5 %酢酸) で脱色して蛋白質を検出した。分子量マーカーには、アマシャムバイオサイエンス社のLMW Marker Kit (17-0446-01) を用いた。

SDS-PAGE分析の結果、25kDa蛋白質が増強されている形質転換体が見出され、これら形質転換体では目的とするセルラーゼが生産されていることが確認された。これら形質転換体のうち、セルラーゼA162P、K166E、及びAPKEを生産する形質転換体としてK215-40株、K215-42株、及びK229-72株をそれぞれ選択し以降の解析に使用した。また、国際公開第W0 01/90375号パンフレットに記載されたNCE5 (親セルラーゼ) を解析のコントロールとして使用した。

### 実施例3：各形質転換体から得られたセルラーゼの評価

フミコーラ・インソレンス形質転換体K215-40株、K215-42株、及びK229-72株を (N) 培地で、37°C、5日間培養して得られた培養上清を用いて、(1) pH 6.0、(2) pH 6.0且つリニアアルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) 200 ppm 添加、(3) pH 10.0の3試験区でEGU活性を測定した。

EGU活性は以下のようにして測定した。基質溶液として、カルボキシメチルセルロース (Hercules社製) を終濃度3.5%となるように適切な緩衝液に溶解した。すなわち、pH 6.0で測定する場合は0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.0) に、また pH 10.0で測定する場合は0.1 mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH 10.0) に溶解した。



基質溶液5 mLを試験管に取り、40℃の恒温槽にいれ10分間予熱した。これに試料溶液0.15 mLを加え、良く攪拌し、40℃で酵素反応を開始した。30分間反応させた後、40℃に設定しておいたR型粘度計（東機産業RE 100）で粘度を測定した。各酵素反応条件下において、初期粘度を1/2に低下させる酵素量を1単位とした。試験区（1）における酵素活性を100%として試験区（2）及び（3）の酵素活性を相対値で示すと以下の表のようになった。

表 1

| 試料              | 試験区 |      |      |
|-----------------|-----|------|------|
|                 | (1) | (2)  | (3)  |
| K215-30 (A162P) | 100 | 26.6 | 29.6 |
| K215-42 (K166E) | 100 | 26.7 | 29.5 |
| K229-72 (APKE)  | 100 | 21.1 | 36.6 |
| NCE (親セルラーゼ)    | 100 | 7.6  | 21.5 |

以上の結果から、各セルラーゼ（A162P、K166E、及び APKE）は、親セルラーゼと比較してLASに対して耐性で且つアルカリ性条件下で高い活性が保持されることが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明の新規なセルラーゼは、親セルラーゼと比較して界面活性剤に対して耐性であること及びアルカリ性条件下でより強い活性を示すことから、衣料用洗淨剤に配合した場合に有用である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号3～5の配列で表される各アミノ酸配列は、界面活性剤耐性セルラーゼである。配列番号6～7の配列で表される各塩基配列は、部位特異的変異導入用プライマーである。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

## 請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるセルラーゼの 162 番目及び／又は 166 番目のアミノ酸残基が、前記セルラーゼのアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列、あるいは、(2) 前記アミノ酸配列 (1) の N 末端に 1 又は複数個のアミノ酸が付加又は欠失したアミノ酸配列を有する、セルラーゼ。
2. 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のセルラーゼ。
3. 166 番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されている、請求項 1 に記載のセルラーゼ。
4. 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載のセルラーゼ。
5. 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するセルラーゼ。
6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼをコードするポリヌクレオチド。
7. 請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。
8. 請求項 7 に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。
9. 請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、その宿主及び／又はその培養物からセルラーゼを採取する工程を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼの製造法。
10. 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼを含む、セルラーゼ調製物。
11. 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、又は請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物を含む、洗剤組成物。
12. セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。
13. セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、

又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

14. セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的として減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

15. 着色されたセルロース含有繊維の色を澄清化する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

16. 着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

17. セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 11 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

18. 繊維の処理がその繊維の浸漬、洗濯、又はすすぎを通じて行われる、請求項 12～17 のいずれか一項に記載の方法。

19. 古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする、古紙の脱インキ方法。

20. 紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、前記方法。

21. 動物飼料の消化能を改善する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のセルラーゼ、請求項 10 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、前記方法。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Meiji Seika Kaisha, Ltd.

&lt;120&gt; Novel detergent resistant cellulase

&lt;130&gt; MEJ-696

&lt;150&gt; JP 2002-318303

&lt;151&gt; 2002-10-31

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (1)..(205)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro  
1 5 10 15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp  
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys  
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala  
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly

2/8

65

70

75

80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr  
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly  
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro  
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys  
145 150 155 160

Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp  
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser  
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg  
195 200 205

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 615

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;400&gt; 2

cagtcgggca gcggccgcac cacgcgctac tgggactgct gcaagccgtc gtgcgogtgg 60

cccggcaagg gcccgggccc cgtgcggacg tgcgaccggt gggacaaccc gctgttgcac 120

ggcggaaca cgcgagcgg gtgcgacgc ggcgcgggcg cctacatgtg ctgggaccag 180  
 agcccggtggg cggtcagcga cgacctggcg tacggctggg cggccgtcaa cattgccggc 240  
 tccaacgaga ggcagtgggtg ctgcgcctgc tacgagctga ccttcaccag cgggcccgtg 300  
 gcgggcaaga ggatgattgt gcaggcgagc aacacgggag gcgatttggg gaacaaccac 360  
 tttgatattg ctatgcccg cggtagcgtc ggtatcttca acgctgcac cgaccagtac 420  
 ggcgcgcccc ccaacggctg gggccagcgc tacggcgga tcagccaacg ccacgagtgc 480  
 gacgccttcc cggagaagct caagcccggc tgctactggc gctttgactg gttcctcaac 540  
 gccgacaacc cgagcgtaaa ctggcggcag gtcagctgcc cggccgagat tgtggccaag 600  
 agcggctgct cggt 615

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A detergent resistant cellulase

<400> 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Gly | Ser | Gly | Arg | Thr | Thr | Arg | Tyr | Trp | Asp | Cys | Cys | Lys | Pro |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Cys | Ala | Trp | Pro | Gly | Lys | Gly | Pro | Ala | Pro | Val | Arg | Thr | Cys | Asp |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Trp | Asp | Asn | Pro | Leu | Phe | Asp | Gly | Gly | Asn | Thr | Arg | Ser | Gly | Cys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala

50

55

60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly  
65 70 75 80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr  
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly  
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro  
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys  
145 150 155 160

Asp Pro Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp  
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser  
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg  
195 200 205

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: A detergent resistant cellulase

&lt;400&gt; 4

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro  
1 5 10 15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp  
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys  
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala  
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly  
65 70 75 80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr  
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly  
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro  
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys  
145 150 155 160



Asp Ala Phe Pro Glu Glu Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp  
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser  
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg  
195 200 205

<210> 5

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A detergent resistant  
cellulase

<400> 5

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro  
1 5 10 15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp  
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys  
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala  
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly  
65 70 75 80

7/8

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr  
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly  
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro  
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys  
145 150 155 160

Asp Pro Phe Pro Glu Glu Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp  
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser  
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg  
195 200 205

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: A primer for site-directed mutagenesis

&lt;400&gt; 6

ggggaagggg tcgcactcgt ggcgttg

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for site-directed mutagenesis

<400> 7

cttgagctcc tcggggaagg cgtcgca

27

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for site-directed mutagenesis

<400> 8

gagtcctcgc gggaaggggt cgcactcgtg

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14013

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N9/42, C12N15/56, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N9/42, C12N15/56, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                         | Relevant to claim No.       |
|---------------|--|-----------------------------|
| <u>X</u><br>A | WO 01/90375 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.),<br>29 November, 2001 (29.11.01),<br>Full text<br>& EP 1291431 A | <u>1, 3, 6-21</u><br>2, 4-5 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
11 December, 2003 (11.12.03)

Date of mailing of the international search report  
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N9/42, C12N15/56, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N9/42, C12N15/56, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                          | 関連する<br>請求の範囲の番号            |
|-----------------|--|-----------------------------|
| <u>X</u><br>A   | WO 01/90375 A1 (明治製菓株式会社) 2001.11.29, 全文<br>& EP 1291431 A | <u>1, 3, 6-21</u><br>2, 4-5 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4N 3126